

【解 説】

トドマツの低・高標高由来ゲノムによる秋の低温馴化調節

石 塚 航^{*,1}

はじめに

北方に分布する常緑針葉樹は季節的に訪れる氷点下以下の低温へ適応するため、低温馴化と呼ばれる応答を進化させてきた (Aitken and Hannerz 2001 ; Chuine 2010)。低温馴化は、光合成活性の高いステージから、細胞内の構成や化学的変化を含む一連の生理状態の変化を経て、耐凍性の高いステージに移行する応答を言う。この低温馴化応答は、秋期、最低気温が氷点下になる前にみられるのだが (Kozłowski and Pallardy 2002)、いかに成長を長く継続させつつ、凍害を被るリスクを小さくするかという、成長―凍害回避の間のトレードオフがあるため、応答のタイミングが重要になる (Chuine 2010)。そのため、低温馴化応答は自生地環境に最適化されていることが知られ、たとえ同一種内であっても、高緯度・高標高といった、より寒冷で厳しい環境に自生する集団は、自生環境への適応の結果、早いタイミングで低温馴化する遺伝的変異を固定させていることがある (Rehfeldt 1989 ; Skråpaa and Magnussen 1993 ; Oleksyn et al. 1998 ; Notivol et al. 2007 ; Mimura and Aitken 2010)。このような適応的変異の実態を知るには、共通圃場試験や相互移植試験が強力なツールとなるものの (Savolainen et al. 2007)、そこでみられる変異が、実際にどのような遺伝的基盤によって発現するか (遺伝するか) を知るには、生育環境、遺伝的背景が共に既知な材料を用いた交配実験等、次世代の表現型により検証することが求められる。繁殖開始までに時間のかかる樹木では、そのような遺伝性にまで言及した生態学的研究は乏しい。

北方域の常緑針葉樹の1種、モミ属トドマツ (*Abies sachalinensis*) は、北海道全域に分布し、しばしば極相林の優占種となることから、生態的に重要であるとともに、北海道ではカラマツと並ぶ造林面積を誇り、主要造林樹種としての林業的価値も高い。また、本種は北海道中央部において低地帯から標高約 1600 m にまた

がる幅広い垂直分布を示し、冬期の寒冷な環境下でも生育が可能である。これまでの研究から、本種は垂直分布に沿った明瞭な遺伝的変異を有しており、それぞれの集団が自生する標高環境へ適応していることが示唆されている (倉橋・濱谷 1981 ; Eiga and Sakai 1984 ; Ishizuka and Goto 2012 ; Ishizuka et al. 2015a)。相互移植試験を扱った研究からは、成長や生残における変異の実態が報告され (倉橋・濱谷 1981 ; Ishizuka and Goto 2012)、さらに、高標高集団ほど早く低温馴化し十分な耐凍性を持つという変異パターンも検出され、適応形質の1つとなりうると考えられた (Eiga and Sakai 1984 ; Ishizuka et al. 2015a ; 石塚ら 2015)。それと並行して、低・高標高集団間の人工交配をもとにした交配試験も設定され (倉橋・濱谷 1981)、交配組合せに応じて成長特性に差異があることが報告された (Goto et al. 2011)。その交配試験個体は現存するため、さらに次代を作出し、適した材料を揃えれば、表現型解析によって適応形質の変異をより深く検証できると考えられる。

そこで、著者らは、トドマツの適応的な低温馴化に関わる遺伝的基盤を明らかにするため、既存の標高間交配試験をもとに第2世代集団を作出し、この集団を対象として耐凍性試験、および分子遺伝学的手法による父性解析を実施した。本解説では、その Ishizuka et al. (2015b) の研究を取り上げ、トドマツの低温馴化が、標高間の交配第2世代集団内で違うか、それがどのような遺伝的調節で説明できるか、得られた知見を紹介したい。

材料と方法

東京大学北海道演習林の低地 (標高 230 m) に設定されたトドマツ植栽試験地内の個体を採種親とし、2009年の結実種子より材料を得た。本植栽試験地に植栽されているのは、低標高 (標高 400 ~ 530 m、以降 L) 自

* E-mail: wataru.ishi@gmail.com

¹ いしづかわたる 北海道立総合研究機構林業試験場

生集団と高標高（標高 1100 ～ 1200 m、以降 H）自生集団間の相互交配で得た交配第 1 世代（以降 F_1 ）苗である（倉橋・濱谷 1981 ; Goto et al. 2011）。人工交配は 1979 年に実施され、 F_1 として以下の 4 つの交配型（♀×♂）が作出された： $L \times L$ 、 $L \times H$ 、 $H \times L$ 、 $H \times H$ （図-1）。これらは交配型、母樹別に管理され、植栽されている。 F_1 353 個体のうち、2009 年に 22 個体の開花が観察され、全交配型にまたがるよう 13 個体から採種を行った（表-1）。種子は全て開放受粉によって得られた。なお、この試験地の周囲は成熟人工林によって取り囲まれている。人工林の苗木の由来は F_1 のそれと異なり、遺伝的組成を異にする。

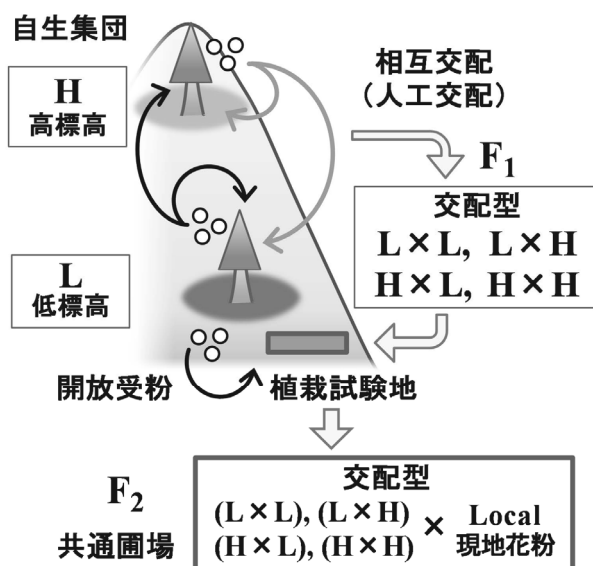


図-1 トドマツの第 2 世代集団の作出と試験デザイン。低・高標高集団間の相互交配による F_1 集団から、開放受粉によって第 2 世代集団を作出した。Ishizuka et al. (2015b) を改変。

表-1 植栽試験地におけるトドマツ F_1 集団の現況

交配型	生存	開花	採種
$L \times L$	144	7	3
$L \times H$	62	4	3
$H \times L$	59	4	3
$H \times H$	88	7	4
計	353	22	13

採種を行った 2009 年の値で、29 年生。Ishizuka et al. (2015b) を改変。

軟 X 線を用いて充実種子のみを選別した後、翌春、同演習林苗畑（標高 220 m）へ、採種母樹別に 1 粒ずつ 4 cm 間隔の格子状に播種し、発芽させた（平均発芽率 79%）。これによって、本研究に用いた第 2 世代集団を得た（図-1）。第 2 世代集団は、共通圃場試験としてそのまま苗畑で育成させた。耐凍性試験はこのうち一部を用いて実施した。2010 年 10 月に母樹別に計 605 個体をポットへ移植して供試材料とし、10 ～ 11 月の時期別に、曝露させる低温も変えつつ（ -15°C 、 -30°C ）、耐凍性試験を 5 回行った。1 回の試験では、1 母樹あたり 10 個体（全得苗数が少ない 3 母樹では 7 個体）、計 121 個体を供試した。なお、そのうち 2 回の試験では（10 月下旬と 11 月上旬に実施した -15°C 曝露試験）、全実生がすでに十分な耐凍性を有していたために、低温に曝しても被害が観察されなかった。そのため、それらは除き、3 回の耐凍性試験のみを本研究にて扱う：Test 1（10 月上旬実施、 -15°C 曝露）、Test 2（10 月下旬、 -30°C ）、Test 3（11 月上旬、 -30°C ）。

1 回の耐凍性試験では、 5°C のチャンバーに入れたポット個体を、毎時 2°C の気温降下を経て目的の低温に 4 時間曝露させ、毎時 2°C の気温上昇を経て再び 5°C へと戻す。その後、12 時間日長条件の植物育成チャンバーに移し、2 週間後に凍結による被害の程度を評価した。もしも、曝露した低温に耐えられるほど十分に耐凍性を高めていない場合には、個体の針葉が褐色になる（Eiga and Sakai 1984）。そのため、凍結による被害は葉の褐色化が観察されるかどうかで知ることができる。また、葉の褐色化の程度は F_v/F_m 値といった定量的な葉の生理活性の値ともよく相関し、目視によるスコアリングは簡便で信頼たる方法であることが知られる（Lindgren and Hallgren 1993 ; Ishizuka et al. 2015a）。そこで、凍害スコアとして、褐色化した割合に準じて 0 から 5 までの 6 段階で評価することとした。凍害スコア 0 だと被害なし、5 では致死となる。3 回行った耐凍性試験の凍害スコアをもとに、後述する遺伝モデル解析を行うこととした。

なお、今回使用した第 2 世代集団は開放受粉で得られたことから、その父性の検証のために、SSR マーカーを用いた分子遺伝学的解析も行った。耐凍性試験に用いた個体とは別に第 2 世代集団から 80 個体を解析に供し、 F_1 植栽試験地内の 2009 年開花 F_1 、全 22 個体とともに（表-1）、4 座の核 SSR、3 座の葉緑体 SSR を調べ、遺伝子型を決定した。詳細は原著（Ishizuka et al. 2015b）を参照していただくこととし、簡略に結果を述べると、使用した全 7 マーカーの平均アリル数（ N ）は 15.0、候補親となりうる 22 F_1 個体の遺伝子型は全て異なり、十

分な精度で父性解析が行えると判断された。CERVUS 3.0 (Kalinowski et al. 2007) と単純排斥法を組み合わせた結果、 F_1 自殖率は 0%、試験地内の F_1 他個体間の交配率が 8.7%、花粉親不明、すなわち F_1 母樹が試験地外の現地花粉を受け取った割合が 91.3% と推定された。これは、 F_1 が若齢 (29 年生) のため開花率が低く (表-1)、個体サイズも小さく、その周囲の成熟林よりも圧倒的に花粉量が少なかったためと考えられる。このような外部花粉率が高い例は、採種園が若齢な場合でも観察されている (Ozawa et al. 2009)。さらに、今回花粉親と推定された F_1 は交配型が全て $L \times L$ だったことも特定されているため、高標高集団が組合せに用いられた F_1 は花粉親として寄与していないと推定された。

これら父性解析の結果に基づけば、低温馴化の変異がどのような遺伝的調節に依っているか解析するためには、父親側からのゲノム効果は一律と仮定し、母親側から受ける効果、とくに母親側からのみ受け継ぐと推定された高標高集団由来ゲノム (高標高ゲノム) の挙動に着目すればよいと著者らは考えた。そこで、いくつかの異なる遺伝効果を仮定した遺伝モデルを構築し、測定された凍害スコアのばらつきを説明できるか検証することとした。まず、モデルの基本構造を考える。ある耐凍性試験における凍害スコア Y は、その母樹の交配型の効果 C と交配型にネストされて表現される母樹の効果 M (C) からなる以下のモデルで説明できると仮定する。

$$Y = \mu + C + M(C) + E \quad (\text{Model 1})$$

ここで、モデル内の μ は第 2 世代集団の凍害スコアの平均値を、 E は誤差を示す。Model 1 の妥当性の検証は原著 (Ishizuka et al. 2015b) を参照いただきたい。この基本モデルを発展させ、遺伝効果と複数回実施した耐凍性試験の試験回ごとの違いを組み込んだフルモデルを構築した。なお、仮定した遺伝効果 C の違いによって Model 2 ~ 5 の 4 つのフルモデルを構築したが、全て以下のモデル構造にて同様に表される。

$$Y_{ijkl} = \mu + C_i + T_l + C_i \times T_l + M_j(C_i) + M_j(C_i) \times T_l + E_{ijkl} \quad (\text{Model 2 ~ 5})$$

ここで、 Y_{ijkl} は交配型 i における母樹 j の実生 k が l 回目の耐凍性試験で示した凍害スコアを表す。新たに追加された T_l は耐凍性試験の試験回の効果を示し、他項との交互作用もフルモデルにて仮定している。Model 2 ~ 5 とした 4 モデルは、想定した遺伝効果に違いがある。本研究において材料とした第 2 世代集団は、母親の交配型、および、それに起因して、受け継いだ高標高ゲノム割合 (期待値) に違いがある (図-1)。そこで、

まず、表現型が単純に高標高ゲノムの割合にのみ影響される場合を考える。これは高標高ゲノム遺伝割合の線形効果によって表すことができる。これを Model 2 とした。続いて、交配型の違いが何かしらの影響を与えている場合を考える。これは、たとえば調節を司る遺伝子が、Sykes et al. (2006) に実証例があるように強い遺伝子間交互作用を有していたり、そもそも高・低標高とは別の因子に依っていたりし、Model 2 の線形の傾向に従わない場合である。これを Model 3 とした。または、本研究と同じ F_1 を試験材料とした Goto et al. (2011) において報告されたような、標高間交配 (交雑) による遠交弱勢などがはたらく場合も考えられる。これを Model 4 とし、標高間交配母樹の影響に着目することとして、Model 3 と区別した。さらに、Model 5 として、Model 2・4 の効果が組み合わさって表現型へ影響している場合を考えた。なお、表現型にそのどれもが寄与していない場合も当然考えられるのだが、この可能性については、後述する変数選択をすることで同時に考慮される。

実際にモデルに組み込む C の変数としては、以下のように定義される。Model 2 が高標高ゲノムの遺伝割合を数値 ($L \times L=0$; $L \times H, H \times L=0.25$; $H \times H=0.5$); Model 3 が母親の交配型を因子 ($L \times L$; $L \times H$; $H \times L$; $H \times H$); Model 4 が標高間交配かどうかを因子 ($L \times H = \text{"Hyb}_{LH}$ "; $H \times L = \text{"Hyb}_{HL}$ "; $L \times L, H \times H = \text{"NoHyb"}$); Model 5 が Model 2 と Model 4 の効果をミックスさせた順序因子 ($L \times L=0$; $L \times H=0.25+\alpha$, $H \times L=0.25-\alpha$; $H \times H=0.5$)。モデルは R 3.1.2 (R Development Core Team 2014) の CLMM (cumulative link mixed model) を用いて解析した (Lee 1992)。解析ではまず、それぞれのモデルごとに、フルモデルからの変数選択を行って最適な変数セットを決めた。この際にもしも遺伝効果 C が除外されれば、仮定した効果は表現型をよく説明できていないことになる。続いて、変数選択後の各モデルで、パラメータの最尤推定とあてはまりの良さを示す AIC (Akaike Information Criterion) の算出を行った。その後、モデル間比較を行い、最も良く凍害スコアを説明するモデルを探索した。

結果と考察

3 回の耐凍性試験の結果を図-2 に示す。Test 1、Test 2 では、第 2 世代集団の凍害スコアは 0 から 5 までばらついて観察された。一方で、Test 3 においてはほとんどの個体の凍害スコアが 0 で、Test 2 と同じ -30°C におか

れても、凍結による被害がみられなかった。これらの結果は、トドマツの低温馴化の過程をよく表しており、Test 2 から Test 3 までの2週間に、どの個体も十分な耐凍性を獲得していたことがわかる。また同時に、この低温馴化過程に低標高-高標高間の遺伝的変異も観察された(図-2)。Test 1 における凍害スコアの最頻値は、交配型 L × L と H × H の次代がそれぞれ 5 (30.0%) と

0 (45.2%) となり、異なった。標高間で交配させた L × H と H × L では、それらの間のスコア 1 が最頻値だった。同様な傾向は Test 2 でも観察され、交配型 H × H の次代のみ凍害スコアが小さく、最頻値は 1 (51.6%) だった。これらの結果は、交配組合せに高標高集団 (H) が用いられた第2世代ほど、早い時期から耐凍性が高かったことを示す。このことは、高標高域に自生するトドマツほど、遺伝的に低温馴化タイミングが早いという既報の知見 (Ishizuka et al. 2015a) と矛盾なく、低温馴化の調節が遺伝する形質であることを意味している。

なお、低温馴化やその調節を担う機構(至近要因)も、Ishizuka et al. (2015a) にて調べており、低温馴化はある閾値以下の気温を蓄積した“温量”の増大によって進むこと、そのタイミングは閾値と必要な温量の違いによって説明されることが示されている。すなわち、トドマツが有する秋期の気温低下をシグナルとした低温馴化機構の中で、シグナルへの応答性の違いが適応的な調節を担っていると考えられた(石塚ら 2015 も参照)。したがって、本研究で示された、遺伝的基盤による低温馴化調節というのは、おそらく、気温シグナルの応答性を司る遺伝的基盤の差異を介して発揮されていると考えられる。

続いて、モデル解析の結果を表-2 に示す。候補とした Model 2 ~ 5 それぞれにおいて、フルモデルからの変数選択を行った結果、モデルのあてはまりを改善しないとして、すべてのモデルで試験回との交互作用項が排除された。Model 4 では遺伝効果の項も排除された(表-2)。すなわち、Model 4 で仮定した遺伝効果では凍害スコアは良く説明できないことがわかった。変数選択後の各モデルを用いてモデル間比較を行ったところ、遺伝効果が除かれた Model 4 よりも、遺伝効果を含む他の3モデルのあてはまりが良く、中でも Model 2 は AIC が最も低く最良のモデルであったと判断された(表-2)。Model 2 は高標高ゲノムの線形効果を仮定している。凍害スコアは、特定の交配型には依存せず、高標高由来のゲノムをどのくらいの量遺伝したかに規定されていたものと考えられた。また、最尤推定の結果、この効果 (C) には有意な負の係数が推定された(表-3)。つまり、交配型によらず高標高ゲノムを受け継いだ割合の大きい次代ほど、凍害スコアが低い傾向があったことを意味する。以上より、トドマツの標高間の低温馴化調節は量的形質の1つで、単純な相加遺伝分散によって、この調節の説明ができるものと考察された。

ただし、量的形質には、関連するゲノム間の交互作用の他、たとえば母樹効果や事後効果といったエビジェ

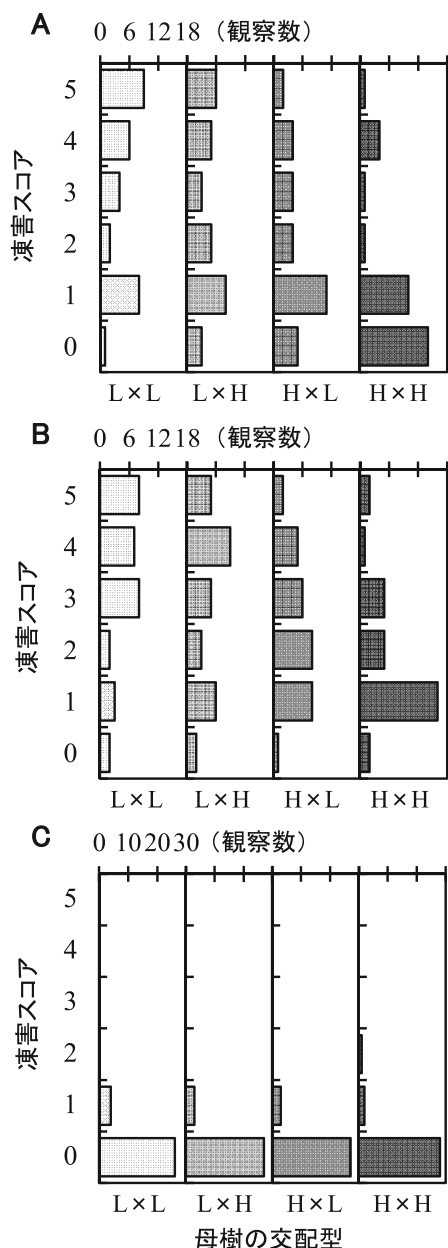


図-2 トドマツの第2世代集団の耐凍性試験結果。AがTest 1(10月上旬、-15°C暴露)、BがTest 2(10月下旬、-30°C)、CがTest 3(11月上旬、-30°C)における凍害スコア。母樹の交配型別にヒストグラムで示した。Ishizuka et al. (2015b) を改変。

表-2 候補モデル別の変数選択結果とモデル間比較

候補 モデル	変 数					AIC
	<i>C</i>	<i>T</i>	<i>C</i> × <i>T</i>	<i>M</i> (<i>C</i>)	<i>M</i> (<i>C</i>) × <i>T</i>	
Model 2	○	○	—	○	—	813.23
Model 3	○	○	—	○	—	815.10
Model 4	—	○	—	○	—	822.90
Model 5	○	○	—	○	—	814.99

*C*は遺伝効果、*T*は試験回の効果、*C* × *T*はそれらの交互作用、*M* (*C*) は母親効果、*M* (*C*) × *T*は母樹と試験回の交互作用。ハイフンは変数選択により除外された変数。最良のモデルを太字で示す。Ishizuka et al. (2015b) を改変。

表-3 最良モデルにおいて推定された係数

Model 2	係数 (SE)	<i>p</i> 値
固定効果		
<i>C</i>	−2.440 (0.580)	<0.001
<i>T</i> (<i>T</i> ₁)	0	—
<i>T</i> (<i>T</i> ₂)	0.336 (0.136)	0.014
<i>T</i> (<i>T</i> ₃)	−8.277 (101.7)	0.935
ランダム効果		
<i>M</i> (<i>C</i>)	≈ 0 (0.206)	

Model 2 における *C* は、線形で記述した高標高ゲノムの効果。*M* (*C*) の効果量は13母樹別に推定されるため、表にはその平均値を示すにとどめた。Ishizuka et al. (2015b) を改変。

ネティック現象も影響しうるので、表現型値の予測は複雑であるといった報告がある (Howe et al. 2003 ; Johnsen et al. 2005 ; Sykes et al. 2006 ; Cané-Retamales et al. 2011)。それらの中には、本研究のように秋のフェノロジー形質に着目し、実際に、トウヒ属樹木 (*Picea*) の冬芽形成タイミングが種子成熟期に母樹がおかれた“環境”に応じて変わり、エピジェネティック現象に適応的役割があると示した例もある (Johnsen et al. 2005)。このような調節がトドマツの自生集団にもはたらきうる可能性は否定できない。しかしながら、本研究で扱った第2世代集団の *F*₁ 母樹は同じ試験地内に生育しており、経験した環境に大きな差はない。また、花粉親も *F*₁ を取り囲む成熟林に由来し、ほぼ遺伝的構成が一律だったと推定されている。さらに、モデル解析にて、特定の母樹や組合せの効果の有無が検証されている。量的形質に関わる複雑な効果の中から、真に遺伝する効果の一端

を評価するには、このような材料・設計を用いたアプローチは有効であったといえよう。組合せによらず、ゲノム割合で低温馴化が説明されるという本結果は、ゲノムの違いがトドマツの低温馴化調節にとって重要であり、たとえ同一地域内でも自生標高が異なれば、生育環境への適応を司るゲノムの違いが集団間に生じうることを強く示唆する。

まとめ

秋期のフェノロジーの遅早は、光合成成長期間の長短のみならず、その後の凍害リスクの多寡にも深く関わるため (Chaine 2010)、生育環境に対応した調節が集団毎にみられ、局所適応の駆動因子となりうる (Aitken and Hannerz 2001 ; Howe et al. 2003)。トドマツの標高適応には、低温馴化タイミングの変異が寄与していると推定されているが (Ishizuka and Goto 2012 ; Ishizuka et al. 2015a)、本研究からは、各標高別集団の持つゲノムに規定された遺伝的調節がそれを担うと考察された。適応形質の調節メカニズムを知することは、今後の森林管理や育種にとっても重要である (Savolainen et al. 2007 ; Aitken et al. 2008)。将来の気候変動下でも高いパフォーマンスを発揮させるためには、適応遺伝子を応用した育種プログラムの実践も有効となりうる。そのためにも、適応に関わる量的遺伝子座を特定していく分子生態・生物情報学的研究が今後求められる。

謝 辞

紹介した成果は、後藤晋氏 (東京大学)、小野清美氏、原登志彦氏 (北海道大学) との共同研究であり、倉橋昭夫氏、高橋康夫氏、東京大学北海道演習林スタッフ、北海道大学低温科学研究所・寒冷域植物生理生態研究室メンバーのご協力によって得られました。謝意を表します。

引用文献

Aitken SN, Hannerz M (2001) Genecology and gene resource management strategies for conifer cold hardiness. In: Bigras FJ, Columbo SJ (eds) , Conifer cold hardiness, 23–53. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The

Netherlands

- Aitken SN, Yeaman S, Holliday JA, Wang TL, Curtis-McLane S (2008) Adaptation, migration or extirpation: climate change outcomes for tree populations. *Evolutionary Applications* 1: 95–111
- Cané-Retamales C, Mora F, Vargas-Reeve F, Perret S, Contreras-Soto R (2011) Bayesian threshold analysis of breeding values, genetic correlation and heritability of flowering intensity in *Eucalyptus cladocalyx* under arid conditions. *Euphytica* 178: 177–183
- Chaine I (2010) Why does phenology drive species distribution? *Philosophical Transactions of the Royal Society B-Biological Sciences* 365: 3149–3160
- Eiga S, Sakai A (1984) Altitudinal variation in freezing resistance of Saghalien fir (*Abies sachalinensis*). *Canadian Journal of Botany* 62: 156–160
- Goto S, Iijima H, Ogawa H, Ohya K (2011) Outbreeding depression caused by intraspecific hybridization between local and nonlocal genotypes in *Abies sachalinensis*. *Restoration Ecology* 19: 243–250
- Howe GT, Aitken SN, Neale DB, Jermstad KD, Wheeler NC, Chen THH (2003) From genotype to phenotype: unraveling the complexities of cold adaptation in forest trees. *Canadian Journal of Botany* 81: 1247–1266
- Ishizuka W, Goto S (2012) Modeling intraspecific adaptation of *Abies sachalinensis* to local altitude and responses to global warming, based on a 36-year reciprocal transplant experiment. *Evolutionary Applications* 5: 229–244
- Ishizuka W, Ono K, Hara T, Goto S (2015a) Use of intraspecific variation in thermal responses for estimating an elevational cline in the timing of cold hardening in a sub-boreal conifer. *Plant Biology* 17: 177–185
- Ishizuka W, Ono K, Hara T, Goto S (2015b) Influence of low- and high-elevation plant genomes on the regulation of autumn cold acclimation in *Abies sachalinensis*. *Frontiers in Plant Science* 6: 890 (doi:10.3389/fpls.2015.00890)
- 石塚 航・小野清美・原 登志彦・後藤 晋 (2015) 北方針葉樹トドマツの低温への適応：耐凍性獲得のタイミングと遺伝的変異. *低温科学* 73: 81–92
- Johnsen Ø, Dæhlen OG, Østreng G, Skrøppa T (2005) Daylength and temperature during seed production interactively affect adaptive performance of *Picea abies* progeny. *New Phytologist* 168: 589–596
- Kalinowski ST, Taper ML, Marshall TC (2007) Revising how the computer program CERVUS accommodates genotyping error increases success in paternity assignment. *Molecular Ecology* 16: 1099–1106
- Kozłowski TT, Pallardy SG (2002) Acclimation and adaptive responses of woody plants to environmental stresses. *Botanical Review* 68: 270–334
- 倉橋昭夫・濱谷稔夫 (1981) トドマツの垂直分布に伴う変異. *東京大学農学部演習林報告* 71: 101–151
- Lee J (1992) Cumulative logit modelling for ordinal response variables: applications to biomedical research. *Bioinformatics* 8: 555–562
- Lindgren K, Hallgren JE (1993) Cold acclimation of *Pinus contorta* and *Pinus sylvestris* assessed by chlorophyll fluorescence. *Tree Physiology* 13: 97–106
- Mimura M, Aitken SN (2010) Local adaptation at the range peripheries of Sitka spruce. *Journal of Evolutionary Biology* 23: 249–258
- Notivol E, Garcia-Gil MR, Alia R, Savolainen O (2007) Genetic variation of growth rhythm traits in the limits of a latitudinal cline in Scots pine. *Canadian Journal of Forest Research* 37: 540–551
- Oleksyn J, Modrzyński J, Tjoelker MG, Zytowski R, Reich PB, Karolewski P (1998) Growth and physiology of *Picea abies* populations from elevational transects: common garden evidence for altitudinal ecotypes and cold adaptation. *Functional Ecology* 12: 573–590
- Ozawa H, Watanabe J, Chen H, Isoda K, Watanabe A (2009) The impact of phonological and artificial factors on seed quality in a nematode-resistant *Pinus densiflora* seed orchard. *Silvae Genetica* 58: 145–152
- R Development Core Team (2014) R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria
- Rehfeldt GE (1989) Ecological adaptations in Douglas-fir (*Pseudotsuga menziesii* var. *glauca*) - a synthesis. *Forest Ecology and Management* 28: 203–215
- Savolainen O, Pyhäjärvi T, Knurr T (2007) Gene flow and local adaptation in trees. *Annual Review of Ecology and Systematics* 38: 595–619
- Skrøppa T, Magnussen S (1993) Provenance variation in shoot growth components of Norway spruce. *Silvae Genetica* 42: 111–120
- Sykes R, Li B, Isik F, Kadla J, Chang HM (2006) Genetic variation and genotype by environment interactions of juvenile wood chemical properties in *Pinus taeda* L.. *Annals of Forest Science* 63: 897–904